

University of Groningen

## Genetic engineering study of the mannitol-specific transport protein in eschericia coli

Weeghel, Robert Paul van

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1991

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Weeghel, R. P. V. (1991). *Genetic engineering study of the mannitol-specific transport protein in eschericia coli: domain organization and functional interactions*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

Bacteriën hebben om te kunnen groeien en delen, voedingsstoffen nodig die naar binnen getransporteerd moeten worden. In de celmembraan dat de bacterie omsluit, bevinden zich nu allerlei gespecialiseerde transporteiwitten die een soort sluis vormen waardoor de opname van deze substraten, zoals vitamines, peptiden, aminozuren en suikers mogelijk is. De suiker specifieke transporteiwitten voor bijvoorbeeld glucose, fructose en mannitol, maken deel uit van het zogenaamde fosfoenolpyruvaat afhankelijke fosfotransferase systeem (PTS)

De opname van PTS-suikers, uitgevoerd door deze transporteiwitten, is een actief proces waarvoor energie nodig is. Deze wordt geleverd door het fosfoenolpyruvaat (PEP) in de cel. In eerste instantie wordt de van PEP afkomstige fosforylgroep via twee cytoplasmatische eiwitten overgedragen op het transporteiwit dat zeer specifiek voor een suiker is. De uiteindelijke overdracht van de fosforylgroep naar de suiker wordt gekatalyseerd door het membraangebonden transporteiwit, ook wel Enzym II genoemd. Een typisch kenmerk van het PT systeem is nu, dat gelijktijdig met het transport van de suiker over het membraan deze gefosforyleerd wordt en als suikerfosfaat in het cytoplasma accumuleert.

Om een beter inzicht te verkrijgen in het functioneren van deze suiker-transporterende Enzym II's, met name de koppeling van suikertransport en -fosforylatie op moleculair niveau, worden de structuur-functie relaties van het mannitol specifieke Enzym II met biochemische, biofysische en moleculair biologische technieken bestudeerd. Ter introductie wordt in hoofdstuk 1 een kort overzicht gegeven van de huidige kennis op het gebied van de PT systemen en in het bijzonder van het mannitol specifieke transporteiwit dat een van de meest bestudeerde Enzym II's is. Daarnaast zijn enkele onderwerpen aangestipt die van belang zijn voor het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven. In dit proefschrift worden een aantal verschillende aspecten van het mannitol specifieke Enzym II uit *Escherichia coli* bestudeerd: de overproductie van dit integrale membraaneiwit in *E.coli*, de constructie van plasmiden die geschikt zijn voor plaatsgerichte mutagenese en expressie van de gemuteerde transporteiwitten, de aanwezigheid van mogelijke structurele en functionele domeinen in Enzym II en de kristallisatie van een afzonderlijk domein.

In hoofdstuk 2 worden experimenten beschreven waaruit blijkt dat een hoge expressie van het transporteiwit in *E.coli* mogelijk is, maar dat dit tevens gepaard gaat met de vorming van inactieve Enzym II aggregaten en extra membraanachtige structuren in de cel. Voor de hoge expressie van Enzym II in de cel, is gebruik gemaakt van een plasmide dat een sterke, reguleerbare promotor ( $P_R$ ) uit bacteriofaag  $\lambda$  bevat, waarachter het structurele gen *mtlA*, dat voor Enzym II codeert, is gekloneerd. De geconstrueerde plasmiden waarmee zowel de plaatsgerichte mutagenese als de expressie van de gemaakte mutante eiwitten kunnen worden uitgevoerd komen in verschillende hoofdstukken van dit proefschrift aan de orde.

Enzym II wordt tijdens het transport van mannitol op twee plaatsen op het eiwit gefosforyleerd. De eerste fosforylatieplaats is een histidine (554) en de tweede fosforylatieplaats is een cysteine (384). Voorgaande studies hebben uitgewezen dat blokkering van een van beide fosforylatieplaatsen leidt tot een inactivatie van het enzym in de mannitol fosforylering. De constructie en expressie van twee fosforylerings-deficiente Enzym II mutanten worden beschreven in hoofdstuk 3. Door middel van plaatsgerichte mutagenese zijn mutaties in het DNA geïntroduceerd die resulteren in een His554 $\rightarrow$ Ala554 en Cys384 $\rightarrow$ Ser384 substitutie. De resultaten laten zien dat beide mutanten, als verwacht, niet in staat zijn om mannitol in de cel te transporteren, omdat de fosforylgroep in het eiwit niet naar de suiker doorgegeven kan worden. Complementatie van beide mutanten leidt daarentegen tot herstel van de fosforylerings-activiteit. Deze resultaten tonen aan dat His 554 van de ene mutant in staat is Cys 384 van de andere mutant te fosforyleren via de vorming van een mogelijke heterodimeer.

Van verschillende andere Enzym II's en Enzym III/II paren zijn tegenwoordig de genen gekloneerd en de nucleotidevolgorden bepaald. Vergelijkingen van de aminozuur sequenties en de bijbehorende molecuulgewichten van de Enzym II's en Enzym III/II paren voorspelden dat de Enzym III onafhankelijke Enzym II's, zoals het mannitol specifieke Enzym II, zeer waarschijnlijk fusieproducten zijn van een membraangebonden Enzym II met een cytoplasmatisch Enzym III. Uit de vergelijking van de aminozuur volgorde van een mannitol specifiek Enzym III uit *S.camosus* en de aminozuursequentie van Enzym II uit *E.coli* werd duidelijk dat het C-terminale gedeelte van Enzym II een domein met een Enzym III activiteit moest bevatten. De in hoofdstuk 4 beschreven experimenten laten zien dat het transporteiwit voor mannitol, uit verschillende domeinen bestaat (IIA, IIB, IIC), die ieder op hun beurt bij het mechanisme van mannitoltransport en -fosforylatie zijn betrokken.

De expressie, zuivering en karakterisatie van het Enzym III domein (IIA) wordt beschreven in

hoofdstuk 4.1. De resultaten laten zien dat dit A domein van 16.3 kDa de al eerder beschreven inactieve fosforylerings mutant EII-H554A kan complementeren in de fosforylering van mannitol. Met dit herstel van activiteit wordt aangetoond dat het A domein door P-HPr kan worden gefosforyleerd en op zijn beurt de fosforylgroep kan overdragen op de tweede fosforylatieplaats Cys 384 van EII-H554A.

Overexpressie van het totale cytoplasmatische gedeelte (IIBA) van Enzym II in *E.coli* was mogelijk door het achter een reguleerbare promotor van bacteriofaag  $\lambda$  te plaatsen. Zoals beschreven in hoofdstuk 4.2, werd het gevormde 31.6 kDa eiwit gezuiverd en vervolgens gebruikt voor drie verschillende complementatie studies. De resultaten maken duidelijk dat beide essentiële fosforyleringsplaatsen, His 554 en Cys 384, zich op dit gedeelte van het transporteiwit bevinden. Het BA domein is tevens in staat de andere helft van het enzym, dat het transmembraandomein vormt, actief te complementeren. De klonering en expressie van het transportdomein (IIC) van Enzym II in *E.coli* wordt kort belicht in hoofdstuk 4.2 en 4.3. De in vivo experimenten van dit domein samen met het cytoplasmatische BA domein, bewijzen dat het C domein in een actieve vorm in het membraan wordt ingebouwd en dat het in de aanwezigheid van het fosforylerende BA domein opname van mannitol in de cel kan catalyseren.

De resultaten van de experimenten met het A domein en het BA gedeelte van Enzym II doen vermoeden dat het eiwit uit twee domeinen bestaat; een A domein voor de associatie met HPr en een B domein voor associatie met het in het membraan gezeten transportdomein. De expressie, zuivering en karakterisatie van het 15.5 kDa B domein wordt besproken in hoofdstuk 4.4. De hierin beschreven experimenten met het gezuiverde B domein laten ten eerste zien dat de tweede fosforyleringsplaats Cys 384 op dit gedeelte van het enzym is gelegen en ten tweede dat het B domein zonder de aanwezigheid van het A domein, het C domein kan complementeren in de fosforylering van mannitol. In tegenstelling tot de resultaten met de inactieve EII-H554A mutant, waar het B domein ingesloten zit tussen het inactieve A domein en actieve C domein en niet door HPr kan worden gefosforyleerd, doen de resultaten met het losse B domein vermoeden dat er toch een HPr bindingsplaats op het B domein aanwezig moet zijn.

Overexpressie van de verschillende actieve domeinen in *E.coli* was mogelijk door de constructie van expressievectoren met verschillende sterke en reguleerbare promotors, zoals de hybride  $P_{trc}$  promotor en de  $P_R$  promotor van bacteriofaag  $\lambda$ . De A, B, en BA domeinen zijn allemaal zo achter een promotor gekloneerd dat ze een translationele fusie met een ATG start codon zouden geven, zodat behalve een extra methionine geen extra aminozuren aan de N-terminus zouden worden toegevoegd. Dit met het oog op een toekomstige 3-dimensionale structuurbepaling van een der domeinen.

Er is een start gemaakt met de bestudering van een hydrofiele loop of domein, die onderdeel is van het hydrofobe transmembraandomein. Deze loop die in tal van andere Enzym II's aanwezig is, wordt verondersteld deel uit te maken van de suiker bindingsplaats en mogelijk betrokken te zijn bij de translocatie van de suiker over het membraan. Bij het construeren van plaatsgerichte mutaties in dit gedeelte van het enzym werd een interessante transport-deficiente mutant gevonden. Hoofdstuk 5 beschrijft een eerste karakterisatie van deze mutant EII-G196D. In-vivo metingen van de fosforyleringssnelheid tonen aan dat suikerfosforylatie vanaf de Cys 384 nog steeds mogelijk is, hoewel de affiniteit van de mutant voor mannitol van  $\mu$ molair naar milimolair is verschoven. Dit bovenstaande resultaat en dat van de transport experimenten suggereren dat het transport gedeelte van het enzym in een vaste stand is gefixeerd, waarbij de mannitol bindingsplaats naar binnen is gericht.

De productie van alle Enzym II domeinen in hoge concentraties in *E.coli* was er tevens op gericht om na zuivering de afzonderlijke domeinen te kunnen kristalliseren. In hoofdstuk 6 worden de eerste resultaten gepresenteerd van kristallen van het A domein met een resolutie van 2.5Å.